

**Zur Biochemie der krankhaften Verhornung,
im besonderen bei Psoriasis.
Proteolytische Aktivität auf der pathologisch
veränderten Haut.**

Ellen Endres

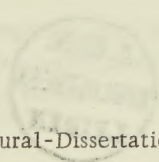
*Frankfurt am Main
1963*

Aus der Dermatologischen Universitätsklinik Frankfurt am Main

Direktor : Prof. Dr. med. F. Herrmann

ZUR BIOCHEMIE DER KRANKHAFTEN VERHORNUNG, IM BESONDEREN
BEI PSORIASIS.

Proteolytische Aktivität auf der pathologisch veränderten Haut.



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin

der hohen medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Ellen Endres

aus Quierschied/Saar

Frankfurt am Main 1963

Dekan : Prof. Dr. J. Frey

Referent : Prof. Dr. G. Steigleder

Korreferent : Prof. Dr. A. Wacker

Mündliche Prüfung : 19. November 1963



Im folgenden wir über die proteolytische Aktivität an der Hautoberfläche unter krankhaften Bedingungen, im besonderen bei Psoriasis, berichtet. Diese Studie setzt vorausgehende Untersuchungen über die proteolytische Aktivität, im folgenden als p. Akt. bezeichnet, auf der Hautoberfläche fort (Steigleder 1962) und ergänzt gleichzeitig eine Mitteilung über die p. Akt. in der psoriatischen Haut (Herrmann und Mitarbeiter 1962, Steigleder, Kamei und Kudicke 1963).

Auf der Hautoberfläche hatte sich eine p. Akt. nachweisen lassen, die damals als Aminopeptidasenaktivität bezeichnet wurde (Steigleder 1962). Inzwischen ist es jedoch wahrscheinlich geworden, daß diese Aktivität nicht nur Aminopeptidasen, also gemäß der modernen Definition Exopeptidasen, zuzuschreiben ist (Karlson 1962, Steigleder 1963). Das von uns verwandte Substrat kann nämlich offenbar auch von Endopeptidasen zerlegt werden (Hasegawa 1963, Hasegawa und Siegel 1962).

Orientierende Untersuchungen zeigten bereits, daß bei Inkubation der Hautoberfläche zum Nachweis p. Akt. die psoriatische Schuppe sich gewöhnlich stärker anfärbt als die Umgebung (Steigleder 1963).

Wir gingen folgendermaßen vor :

I. Methodik

Die Hautoberfläche wurde nach dem Vorschlag von Steigleder inkubiert. Das Inkubationsgemisch wurde in Glasschälchen mit der Hautoberfläche in Kontakt gehalten. Es enthielt als Substrat L-Leucyl- β -naphthylamid und als Kupplungspartner 25 mg Fast Garnet GBC der Imperial Chemical Industries and National Anilin Co (Echtgranatsalz, 4-Amino-3:1-Dimethylazobenzol), gelöst in 40 cm³ 0,025 M Phosphatpuffer (p_H 6,2). Wird aus dem Substrat Leucin abgespalten, verbindet sich der Substratrest mit dem Echtgranatsalz zu einem roten Azofarbstoff. Bei negativem Ausfall färbt das Echtgranatsalz die Hautoberfläche gelblich.

Je 2 ccm des Inkubationsgemisches wurden in Glasschälchen gefüllt und diese so auf normaler Haut und psoriatischen Papeln oder auf anderen Krankheitsherden befestigt, daß das Inkubationsgemisch Kontakt mit der normalen und krankhaften Haut hatte. Kontrollteste wurden auf der klinisch normalen Haut vorgenommen. Allerdings war bei ausgedehnten Veränderungen oft keine unveränderte Haut auffindbar.

Bei 42 Patienten wurden neben dem Test mit dem eben beschriebenen Inkubationsgemisch gleichzeitig Tests durchgeführt, bei denen dem Inkubationsgemisch als Hemmer proteolytischer Enzyme Diisopropylfluorophosphat 1 %ig zugesetzt war (Hasegawa 1963, Hasegawa und Siegel 1962). Bei 32 Patienten kam noch ein dritter Test dazu, und zwar wurde hier dem Inkubationsgemisch der Kallikrein-Trypsin-Inaktivator Trasylol (R) der Firma Bayer, Leverkusen, zugesetzt. (Klaschka 1963, Stüttgen 1963, Stüttgen und Thiel 1963). Von beiden Lösungen wurden jeweils ein Tropfen (= 0,02 ccm) zu 2 ccm Inkubationsgemisch gegeben. Die Wirkung dieser beiden Inkubationsgemische wurde ebenfalls auf Krankheitsherden und gleichzeitig auf klinisch unveränderter Haut geprüft. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten.

II. Untersuchte Kranke

Insgesamt wurden 51 Patienten getestet. Diese waren zwischen 9 und 79 Jahren alt, 32 waren männlichen, 19 weiblichen Geschlechtes.

Diese Patienten litten an folgenden Hautveränderungen :

Tabelle 1.

Psoriasis	30
Dermatitis acuta	4
Dermatitis subacuta	6
Neurodermitis	3
Lupus erythematodes	1
Arzneimittlexanthem	1
Akne vulgaris	1
Parapsoriasis lichenoides acuta	1
Papulöses Exanthem bei Lues II	1
Ichthyosis	1
Aktinische Keratose	1

III. Ergebnisse

Die Schuppen der Psoriasis waren leuchtend rot angefärbt, und zwar deutlich stärker als die umgebende klinisch unveränderte Haut (Abb. 1). Eine etwas schwächere Reaktion zeigten psoriatische Herde, die bereits in Abheilung begriffen waren. Dies war bei 6 von 30 Patienten der Fall.

Die rote Anfärbung der psoriatischen Schuppen war oft nicht homogen, sondern am Rande stärker und in der Mitte schwächer. Auch waren häufig umschriebene Areale innerhalb der Schuppe besonders intensiv gefärbt.

Bei 7 von 18 unter Zusatz von Trasyolol (R) inkubierten Papeln war deren Oberfläche schwächer, bei 5 dagegen stärker gefärbt (Abb. 1), bei 6 Papeln war die Anfärbung ebenso stark wie die Kontrolle, d.h. nach Inkubation ohne Inhibitor.

Die Wirkung von Diisopropylfluorophosphat wurde an 23 Psoriasispapeln geprüft. Bei 5 führte der Zusatz zu stärkerer Anfärbung, bei 8 Patienten zu einer schwächeren, bei 10 entsprach die Anfärbung dem Kontrolltest, d.h. der Anfärbung ohne Inhibitor.

Die Schuppen bei Dermatitis und Neurodermitis zeigten ausnahmslos eine starke p. Akt. (Abb. 2). 4mal führte der Zusatz von Diisopropylfluorophosphat zu einer schwächeren, 3mal zu einer stärkeren Anfärbung im Vergleich zur Inkubation ohne Zusatz. Bei 2 von 7 unter Zugabe von Trasyolol (R) getesteten Patienten war die Anfärbung schwächer, bei 3 stärker als bei normaler Inkubation.

Bei einem Patienten mit Kontaktdermatitis reagierte die Haut schon unmittelbar beim Aufbringen des Inkubationsgemisches

mit dunkelroter Anfärbung. Verschüttetes Substrat führte zu roter Anfärbung, sobald es die Haut berührt hatte.

Bei den übrigen untersuchten Krankheitsbildern färbten sich die Schuppen bei Parapsoriasis lichenoides acuta und die Papeln bei Akne vulgaris sehr stark rot an. Etwas schwächer angefärbt waren die Herde bei den Patienten mit Lupus erythematodes, Arzneimittellexanthem und Lues II. Die ichthyotische Haut und ebenso die aktinische Keratose färbte sich ganz schwach gelb an.

Ferner erhoben wir folgende Befunde :

- 1.) Innerhalb der zur Kontrolle inkubierten scheinbar klinisch normalen Haut waren gelegentlich sehr kleine, makroskopisch nicht erkennbare Effloreszenzen nach dem Test durch ihre intensive Anfärbung deutlich sichtbar (Abb. 2).
- 2.) Die klinisch unveränderte Hautoberfläche färbte sich besonders bei der Psoriasis auffallend schwach. Die Hautoberfläche in der Umgebung der psoriatischen Papel war im Vergleich zur Anfärbung der normalen Haut ungewöhnlich schwach gefärbt.

Manchmal war die Reaktion der klinisch unveränderten Haut negativ, wurde aber durch Zusatz der Inhibitoren wieder positiv.

Auch bei negativer Reaktion der Haut färbte sich der "psoriatische Hof" (Herrmann, Steigleder, Kamei und Kim) schwächer an als die Umgebung.

- 3.) Die Wirkung von Trasylol (R) resp. Diisopropylfluorophosphat war bei ein und demselben Patienten auf gesunder und kranker Haut nicht gleich, oft sogar entgegenge-

setzt, so war zum Beispiel nach Zusatz einer dieser Substanzen die Anfärbung auf der psoriatischen Papel schwächer, auf der normalen Haut aber verstärkt.

- 4.) Die Anfärbung der Psoriasisschuppen und der Oberfläche der normalen Haut war bei ein und demselben Patienten an verschiedenen Tagen nicht gleich.

Wir testeten zwei Psoriatiker 14 Tage nach dem ersten Test noch einmal an der gleichen Stelle. Dabei zeigte sich, daß die Anfärbung auf der psoriatischen Papel wie auch auf der normalen Haut bei beiden Patienten anders war als beim ersten Test.

IV. Besprechung der Ergebnisse

In Schuppen bei entzündlichen Dermatosen läßt sich also durch Inkubation der Hautoberfläche eine starke p. Akt. nachweisen, im besonderen bei der Psoriasis (Abb. 1). Die Aktivität wird schwächer, sobald der Herd abzuheilen beginnt. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Befunde mit anderer Methodik (Herrmann, Steigleder, Kamei und Kim 1962, Steigleder 1963). Allerdings hatten Paschoud, Keller und Schmidli in biochemischen Versuchen gefunden, daß in der psoriatischen Papel die Leuzylglycin- und die Glycinglycildipeptidasen gehemmt sind. Die Alanyl-glycin-Dipeptidasen waren nur bei Versuchsbeginn inhibiert, später ließ sich jedoch eine zunehmende Aktivität nachweisen. Andersartige Peptidasen waren auch in der Psoriasis-papel aktiv.

Grüneberg, Hähnel und Theune bestätigten die Ergebnisse der eben genannten Untersuchergruppe. Ferner fanden sie die Aktivität einer Tripeptidase, nämlich der DL-Alanyl-glycyl-glycin-peptidase, in der Psoriasis-papel in signifikantem Ausmaß gesteigert. In der Psoriasis-papel sind also nicht alle peptidspaltenden Enzyme gehemmt. Ferner erlauben, wie bereits von Herrmann und Mitarbeitern 1960 an anderer Stelle ausgeführt, die eben genannten biochemischen Untersuchungen keine Lokalisation der Enzymaktivität innerhalb der Papel. Die Ergebnisse von Herrmann und Mitarbeitern lassen sogar vermuten, daß die gehemmten Enzyme in der Cutis lokalisiert sind.

Unsere Methodik gestattet nicht zu bestimmen, welcher Natur die Substanzen sind, die das von uns angebotene Substrat, also L-Leucyl- β -naphtylamid, spalten.

Offenbar handelt es sich nicht bei allen Schuppen um gleichartige Körper, denn die dem Inkubationsgemisch zugesetzten

Inhibitoren führen zu einem unterschiedlichen Effekt. Das Fehlen einer vollständigen Hemmung durch Diisopropylfluorophosphat beweist nicht, daß in den Schuppen Aminopeptidasen vorhanden sind. Es ist damit zu rechnen, daß noch andere eiweißspaltende Enzyme durch Diisopropylfluorophosphat nicht gehemmt werden (Hasegawa 1963, Hasegawa und Siegel 1962, O'Connell und Winzler 1963, Steigleider, Kamei und Kudicke 1963). Die gelegentliche Hemmwirkung des Trasylols (R) läßt sich nur schwer deuten, vielleicht darf man aus diesem Phaenomen die Anwesenheit eines trypsin-ähnlichen Enzyms vermuten.

Entsprechend diesen Ergebnissen führt der Zusatz des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors zu Extrakten von der Oberhaut und Cutis zu keiner obligaten Hemmung der p. Akt. (Paschoud, Keller und Schmidli 1956). Auch die Ergebnisse von Klaschka weisen darauf hin, daß die Inhibitionswirkung auf die p. Akt. epidermaler Extrakte nicht einheitlich ist.

Besonders bemerkenswert ist die geringe Aktivität auf der klinisch unveränderten Hautoberfläche bei Hautkrankheiten, im besonderen bei Psoriatikern (Abb. 1). Dieser Befund ist ein weiterer Beitrag dafür, daß bei der Psoriasis die Haut abnormal reagiert (Herrmann, Scher, Coon und Mandol 1960).

Bemerkenswert ist ferner der Befund, daß die Schuppen bei Ichthyosis sich offenbar anders verhalten als bei den untersuchten schuppigen Dermatosen.

Es bleibt offen, was die p. Akt. in den Schuppen bedeutet. Man muß berücksichtigen, daß proteolytische Enzyme nicht nur auf die Struktureiweiße des Gewebes wirken, sondern auch auf Peptide mit besonderer biologischer Wirksamkeit, zum Beispiel auf die Peptidhormone, darunter das Corticotropin, sowie auf manche

Antibiotica und bestimmte Gifte. So ist zum Beispiel das Phalloidin, ein Giftstoff des Knollenblätterpilzes, ein Peptidkörper (Karlson 1962).

V. Zusammenfassung

Es wird die klinisch normale und die pathologisch veränderte Hautoberfläche bei Dermatosen (siehe Tabelle 1) zum Nachweis proteolytischer Aktivität inkubiert. Dabei erweist sich, daß im Vergleich zu normaler Haut die proteolytische Aktivität auf den Schuppen bei einer Reihe entzündlicher Dermatosen, im besonderen aber bei der Psoriasis, gesteigert ist. Diese Steigerung fehlte bei der Ichthyosis und bei der Hyperkeratose der aktinischen Keratose. Die Inhibitoren proteolytischer Enzyme Diisopropylfluorophosphat und der Kallikrein-Trypsin-Inaktivator Trasylol (R) wirken nicht gleichsinnig auf die p. Akt. Es ist also damit zu rechnen, daß die Träger der p. Akt. in den Schuppen nicht immer dieselben sind.

Bemerkenswert ist die geringe p. Akt. auf der klinisch unveränderten Hautoberfläche bei einer Reihe von Dermatosen, im besonderen bei der Psoriasis. Dieser Befund weist auf eine Beteiligung auch der klinisch unveränderten Haut bei solchen Dermatosen hin.

Die starke Anfärbung schuppender Haut läßt mit unserem Verfahren Herde sichtbar werden, die ohne Anfärbung mit bloßen Auge nicht mehr erkennbar sind.



Abb. 1

Hautoberfläche bei Psoriatikern nach Inkubation zum Nachweis proteolytischer Aktivität.

Oben Inkubation von 2 Papeln und umgebender Haut. Man erkennt die stärkere Färbung der Oberfläche der Papeln. Unten klinisch unveränderte Haut nach der Inkubation. Die Reaktion ist ungewöhnlich schwach.

An den mit einem schwarzen Punkt bezeichneten Stellen ist dem Inkubationsgemisch Diisopropylfluorophosphat zugesetzt. Die Reaktion ist bei diesem Patienten verstärkt.

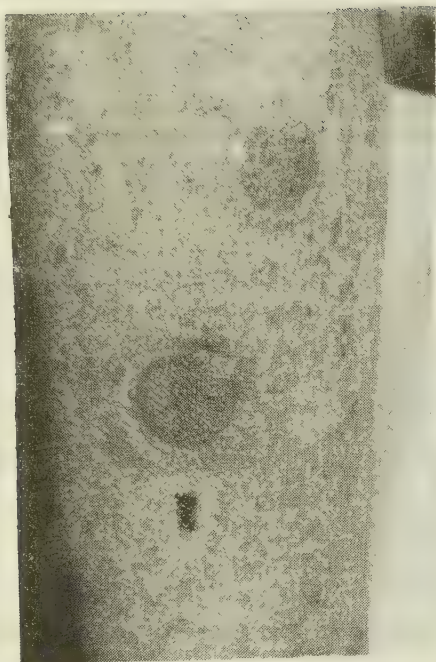


Abb. 2

Inkubation der Hautoberfläche bei Patienten mit Streuherden (Papulovesiculöses Exanthem) bei allergisch bedingter Kontaktdermatitis. Man erkennt, wie sich die punktförmigen Herde deutlich durch ihre stärkere Reaktion von der übrigen inkubierten Haut abheben. Unten nach Inkubation unter Zusatz von Diisopropylfluorophosphat deutlich schwächere Anfärbung der Papeln.

Literaturverzeichnis

Grüneberg, T., R. Hähnel und J. Theune

Über eine Amino-Tripeptidase in der normalen menschlichen Haut und im Psoriasisherd
Arch. klin. exp. Derm. 211, 193 - 196, 1958

Hasegawa, J.

The hydrolysis of L-Leucyl- β -Naphthylamide by a previously undescribed enzyme in wheat germ
J. histochem. and cytochem. 11, 474-477, 1963

Hasegawa, J. and A. Siegel

The hydrolysis of L-Leucyl- β -Naphthylamide by chymotrypsin
J. histochem. and cytochem. 10, 766, 1962

Herrmann, F., R. Scher, W.M. Coon and L. Mandol

The acid number of the lipids on the intact and the stripped skin surface in psoriatics
J. invest. dermat. 35, 47-56, 1960

Herrmann, F., Steigleder, G.K., Kamei, Y. und J.H. Kim

Aminopeptidasenaktivität in der psoriatischen Papel.
Der psoriatische Hof, Mitteilung I
Dermat. Wschr., Bd. 146, Heft 49, 1962

Karlson, K.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 3. Auflage
Thieme Verlag, Stuttgart 1962

Klaschka, F.

Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit des Kallikrein-Trypsin-Inaktivators Trasylol (R) bei Dermatosen
Arch. klin. exp. Derm. 217, 71-81, 1963

O'Connell, W. and R.J. Winzler

Studies on a enzyme in a human serum which
hydrolyzes L-Leucyl- β -naphtylamide
Cancer Res. 23, 78-83, 1963

Paschoud, J.M., W.Keller und B.Schmidli

Untersuchungen über Peptidasen in der gesunden und
in der befallenen Haut von Psoriasiskranken
Arch. klin. exp. Derm. 203, 203-216, 1956

Steigleder, G.K.

Aminopeptidasenaktivität auf der Hautoberfläche
Klin. Wschr. 40, Heft 22, 1154-1156, 1962

Steigleder, G.K.

An der Hautoberfläche nachweisbare Enzyme. Zur
Frage ihrer Bedeutung bei der epidermalen Verhornung
Arch. klin. exp. Derm. im Druck

Steigleder, G.K., Kamei, Y. und R. Kudicke

Die Lokalisation proteolytischer Aktivität in ent-
zündlich veränderter Haut
Arch. klin. exp. Derm. im Druck

Stüttgen, G.

Pathophysiologie allergischer Dermatosen
Hdb.Haut-u. Geschl.Kr.Jadessoohn, Erg. Werk, Bd.1/3,
707

Normale und pathologische Physiologie der Haut
Hrsg.: A.Marchionini u. H.W.Spier, Berlin, Göttin-
gen, Heidelberg, Springer 1963

Stüttgen, G. und H. Thiel

Quantitative Messungen des tryptischen Abbaus der
Milchsäurehydrogenase im menschlichen Serum, in
Hautblasenflüssigkeit und im Sperma
Arch. klin. exp. Dermat. 216, 287-299, 1963

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med.
G. K. S t e i g l e d e r für die Überlassung des
Themas und die freundliche Unterstützung bei der
Ausführung der Arbeit danken.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

" Zur Biochemie der krankhaften Verhornung, im besonderen bei Psoriasis "

in der Dermatologischen Universitätsklinik Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G.K. Steigleder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan "Arch. klin. exp. Dermat." veröffentlicht.

Frankfurt a. M., den 3.9.1963

Ellen Endres

Lebenslauf

Am 23. September 1937 wurde ich als Tochter des Gymnasial-
oberlehrers Dr. Andreas Blug und seiner Ehefrau Annemarie,
geb. Keuper in Quierschied/Saar geboren.

Von 1943 bis 1947 besuchte ich die Volksschule, anschließend
das Auguste-Viktoria-Realgymnasium in Saarbrücken und später
das Realgymnasium in Neunkirchen/Saar, wo ich 1956 die Rei-
feprüfung bestand. Mit dem Studium der Zahnheilkunde begann
ich im Sommersemester 1956, im Februar 1959 legte ich die
zahnärztliche Vorprüfung ab, am 1. August 1962 beendete ich
das zahnärztliche Staatsexamen.

Ich bin mit dem Zahnarzt Dr. Klaus Endres verheiratet.

Frankfurt a. M., den 3.9.1963

Ellen Endres

Meine akademischen Lehrer waren :

Prof. Dr. von Reckow,
Prof. Dr. Kuck,
Prof. Dr. Starck,
Prof. Dr. Wezler,
Prof. Dr. Felix,
Prof. Dr. Altmann,
Prof. Dr. Sandritter,
Prof. Dr. Boenninghaus,
Prof. Dr. Kühne,
Prof. Dr. Landes,
Prof. Dr. Greef,
Priv. Dozent Dr. Kleinschmidt.

